

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
11 janvier 2001 (11.01.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/02437 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷:
C07K 14/75, A61K 38/36, A61P 19/02, G01N 33/53

Guy [FR/FR]; Résidence du Lac, Appartement 46, 10,
avenue Winston Churchill, F-31100 Toulouse (FR). SEB-
BAG, Mireille [FR/FR]; 3, rue A. Frédeau, F-31500
Toulouse (FR).

(21) Numéro de la demande internationale:
PCT/FR00/01857

(22) Date de dépôt international: 30 juin 2000 (30.06.2000)

(74) Mandataires: VIALLE-PRESLES, Marie-José etc.;
Cabinet Ores, 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).

(25) Langue de dépôt: français

(81) États désignés (*national*): CA, JP, US.

(26) Langue de publication: français

(84) États désignés (*régional*): brevet européen (AT, BE, CH,
CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,
SE).

(30) Données relatives à la priorité:
99/08470 1 juillet 1999 (01.07.1999) FR

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*): UNI-
VERSITE PAUL SABATIER - TOULOUSE III
[FR/FR]; 118, route de Narbonne, F-31062 Toulouse
Cedex 4 (FR).

Publiée:
— Avec rapport de recherche internationale.

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*): SERRE,

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: FIBRIN CITRULLINE DERIVATIVES AND THEIR USE FOR DIAGNOSING OR TREATING RHEUMATOID
ARTHRITIS

(54) Titre: DERIVES CITRULLINES DE LA FIBRINE ET LEUR UTILISATION POUR LE DIAGNOSTIC OU LE TRAITE-
MENT DE LA POLYARTHRITE RHUMATOÏDE

(57) Abstract: The invention concerns citrulline polypeptide derived from fibrin useful for diagnosing or treating rheumatoid arthri-
tis.

(57) Abrégé: L'invention concerne des polypeptides citrullinés dérivés de la fibrine utilisables notamment pour le diagnostic ou le
traitement de la polyarthrite rhumatoïde.

WO 01/02437 A1

DERIVES CITRULLINES DE LA FIBRINE ET LEUR UTILISATION
POUR LE DIAGNOSTIC OU LE TRAITEMENT DE LA POLYARTHRITE
RHUMATOÏDE

La présente invention est relative à des
5 dérivés citrullinés de fibrine, et à leurs utilisations
dans le diagnostic et le traitement de la polyarthrite
rhumatoïde.

La polyarthrite rhumatoïde (ci après abrégée
en " PR ") est le plus fréquent des rhumatismes
10 inflammatoires chroniques. Il s'agit d'une maladie auto-
immune ; le sérum des patients atteints contient des
auto-anticorps dont certains sont spécifiques, et peuvent
constituer un marqueur de cette maladie, permettant son
diagnostic même à des stades précoces.

15 Des travaux antérieurs de l'équipe des
Inventeurs ont montré que ces anticorps reconnaissaient
différentes formes moléculaires de la famille des
(pro)filaggrines (pour revue, cf. par exemple SERRE et
VINCENT, In : Autoantibodies, PETER and SHOENFELD Eds,
20 Elsevier Science Publishers, 271-276, 1996). Ces
anticorps ont pour cette raison été dénommés : « auto-
anticorps anti-filaggrine (AAF) » ;. La Demande EP
0 511 116 décrit la purification et la caractérisation
d'antigènes de la famille des filaggrines reconnus par
25 ces anticorps, et leur utilisation pour le diagnostic de
la polyarthrite rhumatoïde.

Les Inventeurs ont montré que les épitopes
reconnus par les AAF étaient portés par des régions de la
molécule de filaggrine dans lesquelles au moins une
30 partie des arginines étaient déiminées, et transformées
de la sorte en citrulline ; des peptides citrullinés
spécifiquement reconnus par les AAF ont ainsi été obtenus
à partir des principales régions immunoréactives de la
filaggrine. Ces peptides, et leur utilisation pour le
35 diagnostic de la PR font l'objet de la Demande
PCT/FR97/01541, et de la Demande PCT/FR98/02899 au nom de

BIOMERIEUX. Les observations des Inventeurs concernant le rôle de résidus citrulline dans la réactivité de la filaggrine avec les auto-anticorps spécifiques de la PR ont été ultérieurement confirmées par d'autres chercheurs
5 [SCHELLEKENS et al., Arthritis Rheum., 40, n° 9 supplément, p. S276, résumé 1471 (1997); VISSER et al., Arthritis Rheum., 40, n° 9 supplément, p. S289, résumé 1551 (1997)].

Les Inventeurs ont en outre montré que les AAF
10 représentaient une proportion importante des immunoglobulines interstitielles des tissus rhumatoïdes synoviaux et qu'ils étaient synthétisés localement par des plasmocytes spécifiques présents dans ces tissus, ce qui confirme l'hypothèse de leur implication dans la
15 réponse auto-immune associée à la PR. L'utilisation de la filaggrine ou de peptides citrullinés dérivés de celle-ci pour neutraliser cette réponse auto-immune fait l'objet de la Demande PCT/FR98/02900 au nom de l'UNIVERSITÉ PAUL SABATIER (TOULOUSE III).

20 Toutefois, l'implication de la filaggrine comme immunogène ou comme antigène-cible dans la réponse auto-immune associée à la PR n'a jamais été constatée. Le véritable antigène impliqué dans cette réponse restait à identifier.

25 Les Inventeurs sont maintenant parvenus à caractériser cet antigène, et ont ainsi montré qu'il se composait de dérivés citrullinés des chaînes α et/ou β de la fibrine.

La présente invention a pour objet un
30 polypeptide citrulliné dérivé de tout ou partie de la séquence de la chaîne α ou de la chaîne β d'une fibrine de vertébré, par substitution d'au moins un résidu arginine par un résidu citrulline.

De préférence, un polypeptide conforme à
35 l'invention comprend au moins 5 acides aminés consécutifs, et avantageusement au moins 10 acides aminés

consécutifs, dont au moins une citrulline, de la séquence de la chaîne α ou de la chaîne β d'une fibrine de mammifère. Avantageusement ladite fibrine de vertébré est une fibrine de mammifère, de préférence humaine.

5 Des polypeptides citrullinés conformes à l'invention peuvent par exemple être obtenus à partir de fibrine ou de fibrinogène naturels, recombinants, ou de synthèse, ou de fragments de ceux-ci comprenant au moins un résidu arginine, par l'action de la peptidyl arginine
10 déiminase (PAD) ; ils peuvent également être obtenus par synthèse peptidique, en incorporant directement un ou plusieurs résidus citrulline, dans le peptide synthétisé.

Des polypeptides citrullinés conformes à l'invention peuvent également être des pseudopeptides,
15 possédant la même structure tridimensionnelle, et donc la même réactivité immunologique que les polypeptides citrullinés dérivés des chaînes α ou β de fibrine ou de leurs fragments, mentionnés ci-dessus. Il peut s'agir par exemple de pseudopeptides de type rétro, dans lesquels
20 des acides L-aminés sont enchaînés selon une séquence inverse de celle du peptide à reproduire, ou bien de pseudopeptides de type rétro-inverso, constitués par des acides aminés de la série D (au lieu des acides aminés de la série L des peptides naturels) enchaînés selon une
25 séquence inverse de celle du peptide à reproduire, ou bien encore de pseudopeptides contenant une liaison $\text{CH}_2\text{-NH}$ à la place d'une liaison peptidique CO-NH . Des pseudopeptides de ces différents types sont par exemple décrits par BENKIRANE et al. [J. Biol. Chem., 270, p.
30 11921-11926, (1995) ; J. Biol. Chem., 271, p. 33218-33224, (1996)] ; BRIAND et al. [J. Biol. Chem., 270, p. 20686-20691, (1995) ; GUICHARD et al. [J. Biol. Chem., 270, p. 26057-26059, (1995)].

La présente invention a également pour objet
35 l'utilisation des polypeptides conformes à l'invention, tels que définis ci-dessus, pour le diagnostic *in vitro*

de la PR.

La présente invention englobe en particulier des compositions antigéniques pour le diagnostic de la présence d'auto-anticorps spécifiques de la PR dans un échantillon biologique, lesquelles compositions sont caractérisées en ce qu'elles contiennent au moins un polypeptide conforme à l'invention, éventuellement marqué et/ou conjugué avec une molécule porteuse.

La présente invention a également pour objet un procédé de détection des auto-anticorps de classe G spécifiques de la PR dans un échantillon biologique, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend :

- la mise en contact dudit échantillon biologique avec au moins un polypeptide conforme à l'invention, tel que défini ci-dessus, dans des conditions permettant la formation d'un complexe antigène/anticorps avec les auto-anticorps spécifiques de la PR éventuellement présents ;

- la détection, par tous moyens appropriés, du complexe antigène/anticorps éventuellement formé.

Ce procédé de détection peut être mis en œuvre grâce à un nécessaire comprenant au moins un antigène selon l'invention, ainsi que des tampons et réactifs appropriés pour la constitution d'un milieu réactionnel permettant la formation d'un complexe antigène/anticorps, et/ou des moyens de détection dudit complexe antigène/anticorps.

Ledit nécessaire peut également comprendre, le cas échéant, des échantillons de référence, tels qu'un ou plusieurs sérum(s) négatif(s) et un ou plusieurs sérum(s) positif(s).

La présente invention a aussi pour objet l'utilisation de polypeptides citrullinés conformes à l'invention pour l'obtention d'un médicament, et notamment d'un médicament destiné à neutraliser la réponse auto-immune associée à la PR, et en particulier à

inhiber la fixation des effecteurs humoraux ou cellulaires de cette réponse auto-immune avec les dérivés citrullinés de chaînes α ou β de fibrine présents dans les tissus rhumatoïdes.

5 Cette neutralisation *in vivo* de la réponse auto-immune, peut participer au traitement de la PR, ou d'autres maladies dans lesquelles interviendraient des lésions induites par une réponse auto-immune dirigée contre des épitopes présentant des réactions croisées
10 avec les dérivés citrullinés de chaînes α ou β de fibrine.

Avantageusement, pour l'administration *in vivo*, on choisira des polypeptides modifiés de manière à prolonger leur durée de vie dans l'organisme, en
15 particulier en augmentant leur résistance aux protéases ; il peut s'agir en particulier de pseudopeptides, tels que ceux mentionnés ci-dessus.

La présente invention englobe également des compositions pharmaceutiques, notamment pour le
20 traitement de la polyarthrite rhumatoïde, caractérisées en ce qu'elles contiennent en tant que principe actif, au moins un polypeptide conforme à l'invention.

Des compositions pharmaceutiques conformes à l'invention peuvent être administrées par tous moyens
25 appropriés, connus en eux-mêmes. Elles peuvent par exemple être administrées de manière systémique, par voie orale, ou par voie parentérale, en injection sous-cutanée, intraveineuse ou intramusculaire ; elles peuvent également être administrées localement, par exemple par
30 injections intra-articulaires, ou par micro-injections sous arthroscopie dans le tissu synovial inflammatoire.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à l'identification de formes déiminées de la
35 chaîne α et de la chaîne β de la fibrine humaine dans les tissus rhumatoïdes, et à l'utilisation de fibrinogène

déiminé pour la détection de la présence d'AAF dans des échantillons de sérum.

EXEMPLE 1 : PURIFICATION ET CARACTERISATION DE PROTEINES ANTIGENIQUES RECONNUES PAR LES AAF DANS LES TISSUS

5 SYNOVIAUX RHUMATOÏDES

1) Analyse des tissus synoviaux rhumatoïdes

Matériel et méthodes :

Les échantillons de tissu synovial utilisés pour les extractions protéiques ont été prélevés chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, au moment d'une synovectomie ou d'une arthroplastie du poignet ou du genou et correspondent tous à des fragments tissulaires qui sont le siège de lésions histologiques classiques de synovite rhumatoïde. Ils sont conservés par
10 congélation dans de l'isopentane refroidi par de l'azote liquide.

Des fragments de tissu synovial provenant de quatre patients ont été extraits de manière séquentielle, successivement dans un tampon de faible force ionique, un
20 tampon urée, puis un tampon urée/DTT.

Préparation des extraits synoviaux

L'extraction a été effectuée à l'aide d'un homogénéiseur Ultra-Turrax (T25 basic, IKA Labortechnik, Staufen, Germany) avec un volume de 6 ml de tampon par
25 gramme de tissu.

Les tampons suivants ont été utilisés à température de 0° C: Tris 40 mM- HCl, pH 7,4, contenant 150 mM de NaCl [tampon de faible force ionique]; Tris 40 mM- HCl, pH 7,4, contenant de l'urée 8M désionisée sur
30 une résine échangeuse d'ions (AG 501-X8, Biorad, Hercules, CA) [tampon urée]; Tris 40 mM- HCl, pH 7,4, contenant de l'urée 8M désionisée et du dithiothréitol (DTT) 50 mM, (Sigma) [tampon urée/DTT]. Tous les tampons ont été supplémentés par de l'EDTA 20 mM, de l'azide de
35 sodium à 0,02%, de l'aprotinine à 2 µg/ml, du

Néthylmaléimide 10 mM et du phénylméthylsulfonyl fluoride 1 mM (Sigma, Saint Louis, MI). Après chaque extraction, les homogénats ont été centrifugés pendant 20 minutes à 15000 g, à la température de 4°C. Les extraits en tampon
5 urée et en tampon urée/DTT ont été dialysés contre de l'eau avant d'être analysés par électrophorèse et par immunotransfert.

Electrophorèse et immunodétection

Les protéines synoviales des différents
10 extraits ont été séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide 10 % en tampon SDS dénaturant (PAGE-SDS) puis ont été électrotransferrées sur des membranes de nitrocellulose renforcée (Hybond-TMC extra, Amersham, Little Chalfont, UK).

15 Les membranes ont été immunodétectées avec les préparations d'anticorps suivantes : sérums humains rhumatoïdes AAF-positifs ou AAF-négatifs ; sérums humains contrôles non-rhumatoïdes issus de patients atteints d'autres rhumatismes inflammatoires ou d'individus
20 sains (1/100) ; fractions d'AAF purifiés (10 µg/ml) ; anticorps monoclonal de souris dirigé contre la fibrine et le fibrinogène humain (5 µg/ml) ; deux antisérums de mouton respectivement dirigés contre les chaînes α et γ recombinantes du fibrinogène humain (1/1000) (Cambio,
25 Cambridge, UK) ; un antisérum de lapin dirigé contre la chaîne β recombinante du fibrinogène humain (1/200000) (Cambio).

Les sérums humains utilisés sont issus de 95 patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (PR)
30 parfaitement caractérisés sur les plans clinique et biologique selon les critères de l'American College of Rheumatology, de 24 patients atteints de rhumatismes inflammatoires non rhumatoïdes ou de pathologies non inflammatoires (sérums contrôles) et de 10 individus
35 sains. La titration semi-quantitative des anticorps anti-filaggrine (AAF) dans les sérums a été réalisée par

immunofluorescence indirecte sur cryocoupes d'épithélium d'œsophage de rat et par immunotransfert sur extraits épidermiques enrichis en variant acide de la filaggrine, selon des protocoles précédemment publiés [VINCENT et al., Ann. Rheum. Dis., 48, 712-722, (1989) ; VINCENT et al., J. Rheumatol., 25, 838-846, (1998)]. Les sérums dits «AAF-positifs» sont ceux qui présentent des AAF à des titres significatifs après détection par les deux méthodes, et les sérums dits «AAF-négatifs» sont ceux qui ne présentent d'AAF détectables par aucune des deux méthodes.

Les AAF ont été purifiés par chromatographie d'affinité sur le variant acide de la filaggrine épidermique selon le protocole décrit par GIRBAL-NEUHAUSER et al. (J. Immunol., 162, 585-594, (1999), à partir de 45 sérums rhumatoïdes de haut titre en AAF. Les fractions d'anticorps purifiés ont été réunies.

Des sondes moléculaires secondaires conjuguées à la peroxydase ont été utilisées pour la détection de tous les anticorps primaires: protein-A (Sigma), anticorps de mouton dirigés contre les IgG de souris, (Biosys, Compiègne, France), fragments Fab de chèvre dirigés contre les IgG de lapin (Biosys) et fragments F(ab')₂ de lapin dirigés contre les IgG de mouton (Southern Biotech. Inc), pour la détection respective des IgG humaines, murines, de lapin, et de mouton. L'activité peroxydase a été visualisée par le système de détection ECL™ (Amersham International, Aylesbury, UK), suivant le protocole proposé par le fabricant.

30 Résultats

Une réactivité spécifique avec les AAF purifiés et les sérums rhumatoïdes AAF-positifs a été observée uniquement dans l'extrait réalisé en tampon urée/DTT.

35 Les résultats sont illustrés par la Figure 1.
Légende de la Figure 1 :

- AFAP = AAF purifiés ;
- sérums PR = sérums rhumatoïdes :
 - * AFA+ = AFA-positifs ;
 - * AFA- = AFA-négatifs ;
- 5 - sérums contrôles = sérums issus de patients atteints d'autres rhumatismes inflammatoires que la PR ou de donneurs sains.

Ces résultats montrent que la réactivité spécifique avec les AAF purifiés et les sérums rhumatoïdes AAF-positifs concerne deux bandes protéiques de poids moléculaire apparent d'environ 64 kD à environ 78 kD (p64-78) et d'environ 55 kD à environ 61 kD (p55-61), respectivement. Ces bandes protéiques n'ont pas été détectées par les sérums AAF-négatifs, qu'ils proviennent de patients atteints de PR ou d'autres rhumatismes inflammatoires, ou bien qu'ils soient issus de donneurs sains.

La présence de ces protéines spécifiquement reconnues par les AAF purifiés et les sérums rhumatoïdes AAF-positifs, a été observée dans les extraits urée/DTT de tissus synoviaux issus des 4 patients rhumatoïdes étudiés.

Au total 48 sérums rhumatoïdes AAF-positifs ont été testés en immunotransfert sur au moins un extrait synovial urée/DTT. Parmi ces sérums, 40 ont reconnu p64-78, 39 ont reconnu p55-61, 37 ont reconnu à la fois p64-78 et p55-61, 3 n'ont reconnu que p64-78 et 2 n'ont reconnu que p55-61.

Treize sérums rhumatoïdes AAF-négatifs ont été testés en immunotransfert sur au moins un extrait urée/DTT de tissu synovial ; aucun de ces sérums n'a reconnu p64-78 ou p55-61.

Dix sérums issus de donneurs sains et 5 sérums issus de patients atteints d'autres rhumatismes inflammatoires ont aussi été testés en immunotransfert

sur au moins un extrait synovial urée/DTT ; aucun de ces sérums n'a reconnu p64-78 ou p55-61.

2) Caractérisation des protéines antigéniques p64-78 et p55-61.

5 Les protéines de l'extrait en tampon urée/DTT du tissu synovial de l'un des patients atteint de PR, ont été précipitées par 4 volumes d'acétone glacial, puis redissoutes dans le tampon urée/DTT à une concentration 15 fois supérieure à leur concentration initiale.

10 Les protéines de l'extrait concentré ont été séparées en électrophorèse bidimensionnelle par isoélectrofocalisation suivie de SDS-PAGE.

Une séparation électrophorétique bidimensionnelle a été réalisée dans le système
15 PhastSystem™ (Pharmacia). La première séparation électrophorétique a eu lieu sur des gels d'isoélectrofocalisation (IEF) PhastGels™ préalablement lavés, séchés et réhydratés dans un tampon désionisé contenant de l'urée 8 M, du Nonidet P-40 à 0,5% et des
20 ampholytes créant un gradient de pH de 3 à 10 (Pharmacia). La deuxième dimension a été réalisée en SDS-PAGE sur des gels à 7,5% de polyacrylamide.

Les protéines ont ensuite été électrotransferrées sur des membranes de
25 polyvinylidifluorure (PVDF) (membranes ProBlott™, Applied Biosystems, Foster City, CA), en Tris 50 mM et acide borique 50 mM. Les membranes ont enfin été colorées par une solution aqueuse d'amido black à 0,1 %, d'acide acétique à 1 % et de méthanol à 45 %, ou bien
30 immunodétectées par des sérums rhumatoïdes selon le protocole décrit en 1) ci-dessus.

La Figure 2 illustre les profils obtenus après électrotransfert sur membrane de PVDF et :

- a) coloration à l'amido-black ; ou bien
35 b) immunodétection par un sérum rhumatoïde AAF-positif ; ou bien

c) immunodétection par un sérum rhumatoïde AAF-négatif.

Légende de la Figure 2 :

- Amido Black = coloration à l'amido-black ;
- 5 - AFA+ = immunodétection avec un sérum rhumatoïde AAF-positif ;
- AFA- = immunodétection avec un sérum rhumatoïde AAF-négatif.

Après coloration à l'amido-black, on observe
10 la présence de deux protéines majoritaires, de poids moléculaire apparent 64-78 kD et 55-61 kD et de pI d'environ 5,85 à environ 8,45.

Ces protéines sont immunodétectées par les sérums rhumatoïdes AAF-positifs, mais pas par les sérums
15 rhumatoïdes AAF-négatifs.

À partir de transferts identiques sur membrane de PVDF après électrophorèse bidimensionnelle, des fragments de membrane correspondant au centre de chaque zone immunoréactive ont été excisés puis soumis à un
20 séquençage amino-terminal dans un séquenceur Applied Biosystems (494A ou 473A) selon le procédé conseillé par le fabricant.

À partir du fragment de membrane correspondant à l'antigène p64-78, la séquence gly-pro-arg-val-val-glu-
25 arg-his-gln-ser-ala a été obtenue. Cette séquence est strictement identique à la séquence 36-46 du produit du gène du précurseur de la chaîne α du fibrinogène humain. Lorsque des fragments de membrane correspondant aux extrémités droite ou gauche de la zone immunoréactive
30 p64-78 ont été excisés puis soumis chacun à trois cycles de séquençage amino-terminal, les séquences gly-pro-arg ont été retrouvées à chaque fois, indiquant que la totalité de la zone immunoréactive p64-78 possède la même extrémité amino-terminale.

35 À partir du fragment de membrane correspondant au centre de la zone immunoréactive correspondant à

l'antigène p55-61, la séquence gly-his-arg-pro-leu-aspartyl-lys-arg a été obtenue. Cette séquence est strictement identique à la séquence 45-54 du produit du gène précurseur de la chaîne β du fibrinogène humain.

5 Lorsqu'un fragment de membrane correspondant à l'extrémité gauche de la zone immunoréactive p55-61 a été excisé puis soumis à deux cycles de séquençage amino-terminal, la séquence gly-his a été retrouvée. Lorsqu'un fragment de membrane correspondant à l'extrémité droite

10 de la zone immunoréactive p55-61 a été excisé puis soumis à six cycles de séquençage amino-terminal, la séquence gly-his-arg-pro-leu-aspartyl-val-glu ont été retrouvées. Ceci indique que la totalité de la zone immunoréactive p55-61 possède la même

15 extrémité amino-terminale et qu'elle comigre partiellement avec l'antigène p64-78.

Les extrémités aminoterminales des protéines antigéniques p64-78 et p55-61 correspondent respectivement aux extrémités aminoterminales des chaînes

20 α et β du fibrinogène humain après clivage respectif par la thrombine des fibrinopeptides A et B. Les extrémités aminoterminales des protéines antigéniques p64-78 et p55-61 sont donc respectivement identiques à celle de la chaîne α et à celle de la chaîne β de la fibrine humaine.

25 Les poids moléculaires apparents des antigènes p64-78 et p55-61 sont compatibles avec les valeurs respectives de poids moléculaires théoriques de la chaîne α et de la chaîne β de la fibrine humaine.

L'identité de l'antigène p64-78 et de la

30 chaîne α de la fibrine d'une part, et celle de l'antigène p55-61 et de la chaîne β de la fibrine d'autre part, ont été confirmées par analyse de la réactivité d'anticorps antifibrin(ogène) vis-à-vis de ces antigènes. En immunotransfert, à partir d'un extrait de tissu synovial

35 -réalisé en urée/DTT, l'anticorps monoclonal de souris "311" qui reconnaît les trois chaînes α , β et,

faiblement, γ du fibrinogène et de la fibrine humaine, est majoritairement réactif vis-à-vis des antigènes p64-78 et p55-61. De même, deux antisérums, l'un de mouton et l'autre de lapin, dirigés respectivement contre les chaînes α et β recombinantes du fibrinogène, ont principalement reconnu, respectivement, une protéine qui comigrerait avec l'antigène p64-78 et une protéine qui comigrerait avec l'antigène p55-61.

EXEMPLE 2 : REACTIVITE DE SERUMS RHUMATOÏDES ET D'AAF PURIFIES AVEC DU FIBRINOGENE DEIMINE IN VITRO.

La réactivité vis-à-vis du fibrinogène déiminé et non déiminé a été étudiée par immunotransfert. Ont été utilisés : les fractions d'AAF purifiées, 37 sérums rhumatoïdes AAF-positifs de titre décroissant, 10 sérums rhumatoïdes AAF-négatifs et 19 sérums AAF-négatifs issus de patients atteints de rhumatismes inflammatoires ou non inflammatoires (titres en AAF déterminés par immunotransfert sur extraits épidermiques enrichis en variant acide de la filaggrine).

Les résultats sont illustrés par la Figure 3A dans le cas du fibrinogène non-déiminé, et par la Figure 3B dans le cas du fibrinogène déiminé.

Légende de la Figure 3 :

Figure 3 A : fibrinogène humain purifié non déiminé ;

- 311 = anticorps monoclonal anti-fibrinogène 311 ;
- sérums contrôles = sérums issus de patients atteints d'autres rhumatismes inflammatoires que la PR ou de donneurs sains ;
- sérums PR = sérums rhumatoïdes ;

* AFA+ = AFA-positifs ;

* AFA- = AFA-négatifs ;

Figure 3 B : fibrinogène humain purifié déiminé par une PAD ;

- 311 = anticorps monoclonal anti-fibrinogène 311 ;
- C1 = anticorps de mouton dirigés contre les IgG de souris ;

- C2 = anticorps de mouton dirigés contre la protéine-A ;
 - sérums contrôles = sérums issus de patients atteints d'autres rhumatismes inflammatoires que la PR ou de donneurs sains ;
- 5 - sérums PR = sérums rhumatoïdes :
- * AFA+ = AFA-positifs ;
 - * AFA- = AFA-négatifs.

Fibrinogène non-déiminé

Après séparation en PAGE-SDS, dans les conditions décrites dans l'exemple 1 ci-dessus, le fibrinogène non déiminé est composé de 3 polypeptides de poids moléculaires apparents respectifs de 48 kDa, 58 kDa et 69 kDa, correspondant aux masses moléculaires apparentes attendues des chaînes polypeptidiques α , β et γ composant la protéine (résultats non présentés). L'anticorps monoclonal anti-fibrinogène "311" reconnaît fortement les chaînes polypeptidiques α et β et très faiblement la chaîne polypeptidique γ (Figure 3A).

Des antisérums spécifiques de chacune des chaînes α , β and γ du fibrinogène ont aussi montré une réactivité vis-à-vis de la chaîne contre laquelle ils étaient respectivement dirigés (résultats non illustrés).

Déimination du fibrinogène

Une peptidyl-arginine déiminase (PAD) purifiée à partir de muscle squelettique de lapin (Sigma, St Louis, MO) a été utilisée. Le fibrinogène humain (Calbiochem, San Diego, CA) a été incubé à la concentration de 0,86 mg/ml, en présence ou en absence de PAD (7 U/mg de protéine) pendant 2h à 50°C, en tampon Tris 0,1 M, HCl pH 7,4, contenant 10 mM de CaCl₂, et 5 mM de DTT. Ces conditions sont celles qui ont préalablement permis de générer les épitopes reconnus par les AAF sur une filaggrine recombinante humaine [GIRBAL-NEUHAUSER et al., J. Immunol., 162, 585-594, (1999)]. La déimination a

ensuite été arrêtée par addition de SDS à 2 % et chauffage à 100°C pendant 3 mn.

Après une déimination de 2 heures, la mobilité électrophorétique en SDS-PAGE des deux polypeptides α et β s'est modifiée, celle du polypeptide γ est restée inchangée. En effet, la protéine correspondant à la chaîne α est alors apparue sous la forme d'une bande diffuse de 82 à 95 kDa et a été immunodétectée à la fois par l'anticorps monoclonal anti-fibrinogène "311" (Figure 3B) et par l'antisérum dirigé contre la chaîne α du fibrinogène (résultats non illustrés).

La protéine correspondant à la chaîne β est apparue sous la forme d'un doublet bien défini de poids moléculaire 58 kD pour la bande inférieure et 60 kD pour la bande supérieure, qui n'a pas été reconnu par l'anticorps monoclonal anti-fibrinogène "311" (Figure 3B) mais a été immunodétecté par l'antisérum de lapin dirigé contre la chaîne β recombinante du fibrinogène humain (résultats non illustrés).

Aucune réactivité de la chaîne α ou de la chaîne β n'est observée avec les anticorps C1 et C2.

Réactivité des sérums

La réactivité des sérums vis-à-vis des chaînes α et β du fibrinogène non déiminé s'est avérée nulle ou très faible et ne concernait que quelques rares sérums n'appartenant à aucun sous-groupe particulier.

En revanche, après déimination, les polypeptides correspondant aux chaînes α et β déiminées sont fortement réactifs avec les AAF purifiés (résultats non-illustrés) et avec la totalité des 37 sérums rhumatoïdes AAF-positifs (à l'exception de celui qui possède le titre le plus faible en AAF). Par ailleurs, 6 sérums rhumatoïdes AAF-négatifs sur 10 ont aussi clairement reconnu les polypeptides α ou β déiminés : 2 ont immunodétecté le polypeptide α et le doublet polypeptidique β , 3 autres ont seulement immunodétecté le

douplet polypeptidique β et 1 seul a immunodéetecté exclusivement le polypeptide α . Par contre, à l'exception d'un sérum issu d'un patient atteint d'un syndrome de Sjögren réactif sur le doublet polypeptidique β , aucun
5 des sérums contrôles n'a immunodéetecté le fibrinogène déiminé.

L'affinité des sérums rhumatoïdes AAF-positifs vis-à-vis des deux polypeptides déiminés α et β s'est révélée légèrement variable d'un sérum à l'autre. Ainsi,
10 6 sérums, alors qu'ils détectaient fortement le polypeptide β , n'ont que très faiblement reconnu le polypeptide α . De même, 3 sérums fortement réactifs vis-à-vis du polypeptide α n'ont pas détecté le polypeptide déiminé β . Par ailleurs, l'intensité de marquage des deux
15 polypeptides paraît globalement proportionnelle au titre en AAF des sérums. Il est à noter que les sérums réactifs sur les polypeptides α et β du fibrinogène déiminés ont également été réactifs vis-à-vis de polypeptides de haut poids moléculaire (supérieur à 200 kD) générés lors de la
20 déimination du fibrinogène. Ces polypeptides clairement réactifs avec les anticorps anti-fibrinogène sont très probablement des aggrégats de chaînes de fibrinogène.

En conclusion, la reconnaissance des polypeptides α et β du fibrinogène par les sérums
25 rhumatoïdes est non seulement entièrement dépendante de leur déimination, puisque les polypeptides non-déiminés ne sont jamais reconnus, mais elle est également clairement liée à la réactivité antifilaggrine de ces sérums. Il est à noter que ces polypeptides déiminés
30 permettent de détecter avec une grande sensibilité les AAF présents dans les sérums rhumatoïdes.

Ces résultats démontrent clairement que les cibles antigéniques des AAF dans les articulations synoviales rhumatoïdes sont des formes déiminées de la
35 chaîne α et de la chaîne β de la fibrine humaine.

REVENDICATIONS

- 1) Polypeptide citrulliné dérivé de tout ou partie de la séquence de la chaîne α ou de la chaîne β d'une fibrine de vertébré, par substitution d'au moins un
5 résidu arginine par un résidu citrulline.
- 2) Polypeptide citrulliné selon la revendication 1, dérivé d'une séquence d'au moins 5 acides aminés consécutifs de la chaîne α ou de la chaîne β d'une fibrine de vertébré.
- 10 3) Polypeptide citrulliné selon une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que ladite fibrine de vertébré est une fibrine de mammifère, de préférence humaine.
- 4) Utilisation d'un polypeptide selon une
15 quelconque des revendications 1 à 3 pour le diagnostic *in vitro* de la polyarthrite rhumatoïde.
- 5) Composition antigénique pour le diagnostic de la présence d'auto-anticorps spécifiques de la polyarthrite rhumatoïde dans un échantillon biologique,
20 caractérisée en ce qu'elle contient au moins un polypeptide citrulliné selon une quelconque des revendications 1 à 3, éventuellement marqué et/ou conjugué avec une molécule porteuse .
- 6) Procédé de détection des auto-anticorps
25 spécifiques de la polyarthrite rhumatoïde dans un échantillon biologique, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend :
- la mise en contact dudit échantillon biologique avec au moins un polypeptide selon une
30 quelconque des revendications 1 à 3, dans des conditions permettant la formation d'un complexe antigène/anticorps avec les auto-anticorps spécifiques de la polyarthrite rhumatoïde éventuellement présents ;
 - la détection, par tous moyens appropriés, du
35 complexe antigène/anticorps éventuellement formé.
- 7) Nécessaire pour la détection des auto-

anticorps spécifiques de la polyarthrite rhumatoïde dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un polypeptide selon une quelconque des revendications 1 à 3, ainsi que des tampons et réactifs
5 appropriés pour la constitution d'un milieu réactionnel permettant la formation d'un complexe antigène/anticorps, et/ou des moyens de détection dudit complexe antigène/anticorps.

8) Utilisation d'un polypeptide citrulliné
10 selon une quelconque des revendications 1 à 3 pour l'obtention d'un médicament.

9) Utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que ledit médicament est destiné à neutraliser la réponse auto-immune associée à la PR.

15 10) Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle contient en tant que principe actif, au moins un polypeptide citrulliné selon une quelconque des revendications 1 à 3.

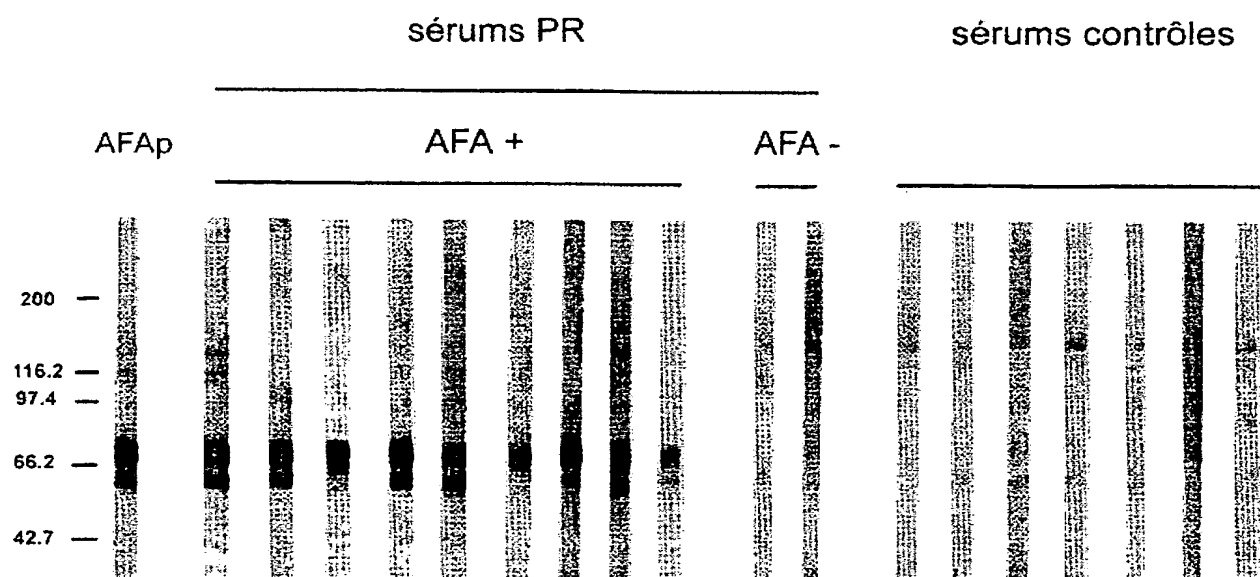


Figure 1

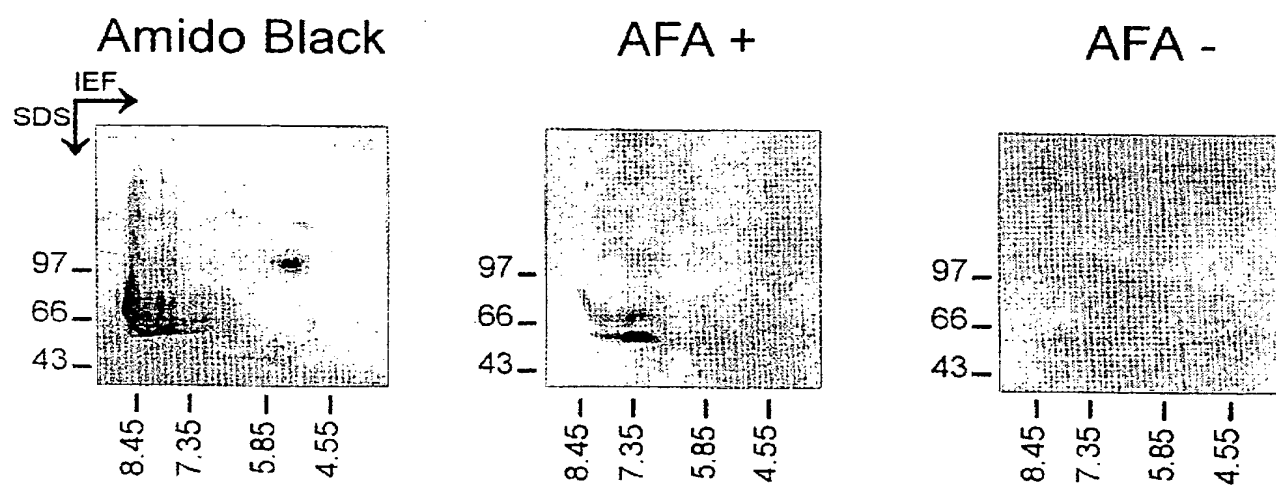


Figure 2

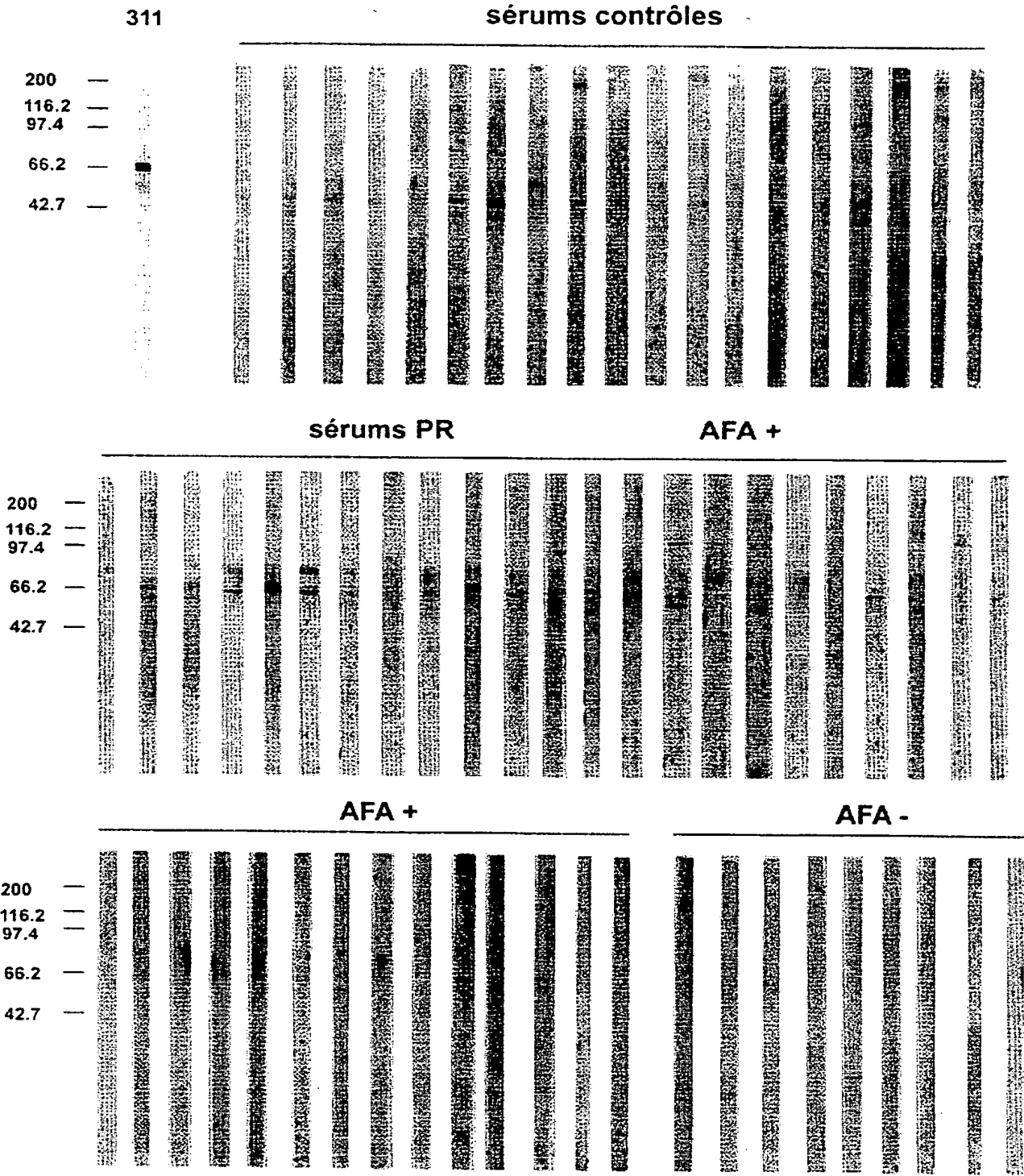


Figure 3A

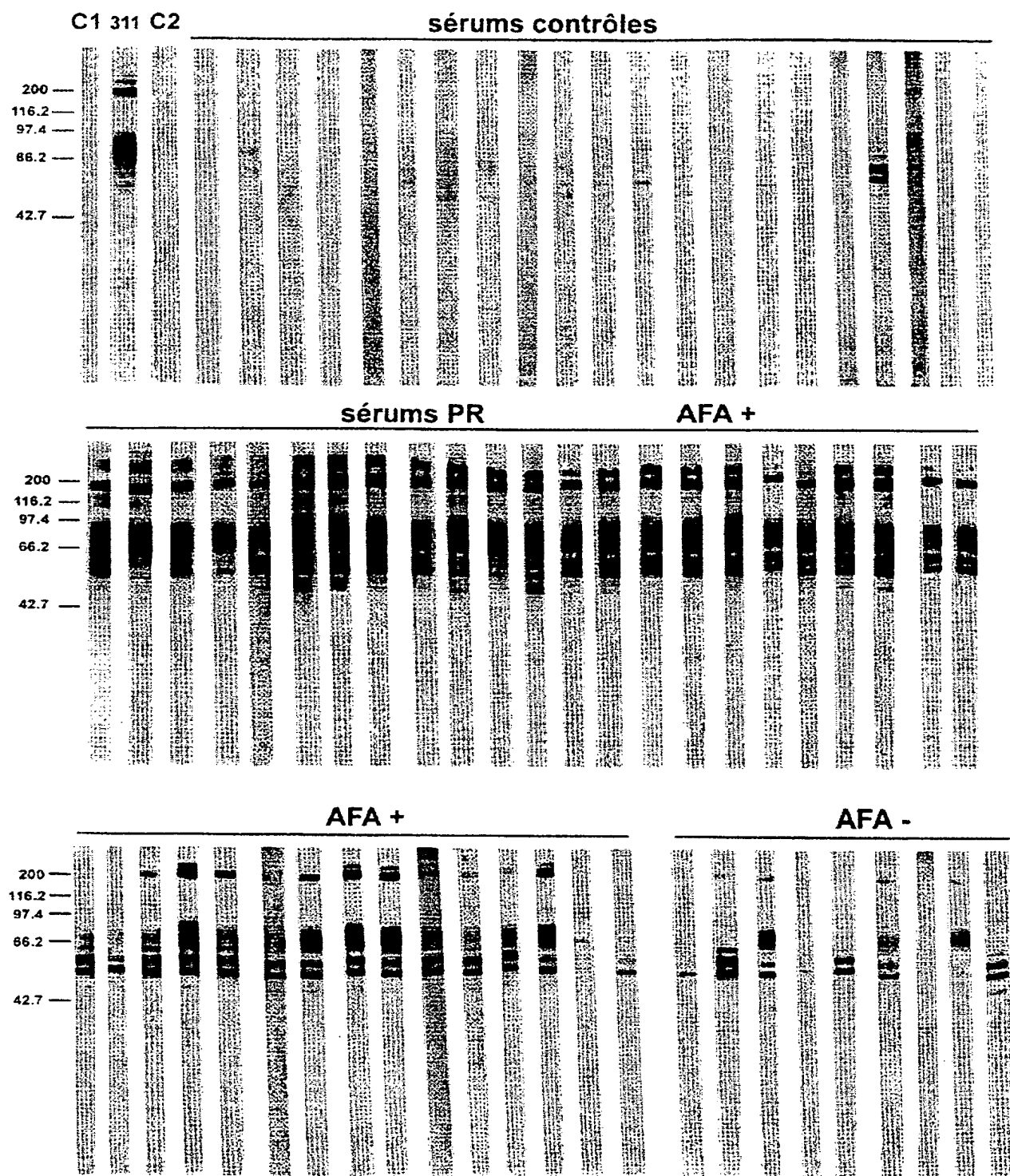


Figure 3B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/01857

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K14/75 A61K38/36 A61P19/02 G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K A61K A61P G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, PAJ, EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98 22503 A (RAATS JOZEF MARIA HENDRIK ; SCHELLEKENS GERARDUS ANTONIUS (NL); HOE) 28 May 1998 (1998-05-28) ---	
A	WO 95 28946 A (SCRIPPS RESEARCH INST) 2 November 1995 (1995-11-02) -----	

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 October 2000

Date of mailing of the international search report

26/10/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Cervigni, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/01857

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9822503 A	28-05-1998	NL 1004539 C	20-05-1998
		AU 4970797 A	10-06-1998
		BR 9712955 A	07-12-1999
		EP 0941244 A	15-09-1999
WO 9528946 A	02-11-1995	US 5599790 A	04-02-1997
		AU 2366295 A	16-11-1995
		US 5919754 A	06-07-1999

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 00/01857

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C07K14/75 A61K38/36 A61P19/02 G01N33/53

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C07K A61K A61P G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

WPI Data, PAJ, EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 98 22503 A (RAATS JOZEF MARIA HENDRIK ; SCHELLEKENS GERARDUS ANTONIUS (NL); HOE) 28 mai 1998 (1998-05-28) ----	
A	WO 95 28946 A (SCRIPPS RESEARCH INST) 2 novembre 1995 (1995-11-02) -----	

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

19 octobre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

26/10/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets. P.B. 5818 Patentlaan 2

NL - 2280 HV Rijswijk

Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,

Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Cervigni, S

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 00/01857

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9822503 A	28-05-1998	NL 1004539 C	20-05-1998
		AU 4970797 A	10-06-1998
		BR 9712955 A	07-12-1999
		EP 0941244 A	15-09-1999
WO 9528946 A	02-11-1995	US 5599790 A	04-02-1997
		AU 2366295 A	16-11-1995
		US 5919754 A	06-07-1999

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference MJPcb1249/2	FOR FURTHER ACTION see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/FR 00/ 01857	International filing date (day/month/year) 30/06/2000	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 01/07/1999
Applicant UNIVERSITE PAUL SABATIER-TOULOUSE III		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 2 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

- a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ the international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

- b. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of the sequence listing :

☐ contained in the international application in written form.

☐ filed together with the international application in computer readable form.

☐ furnished subsequently to this Authority in written form.

☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.

☐ the statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.

☐ the statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box I).

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box II).

4. With regard to the **title**,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. The figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No.

☐ as suggested by the applicant.

☐ because the applicant failed to suggest a figure.

☐ because this figure better characterizes the invention.

☒ None of the figures.

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE		
CIB 7	C07K14/75	A61K38/36 A61P19/02 G01N33/53
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)		
CIB 7 C07K A61K A61P G01N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)		
WPI Data, PAJ, EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A ✓	WO 98 22503 A (RAATS JOZEF MARIA HENDRIK ;SCHELLEKENS GERARDUS ANTONIUS (NL); HOE) 28 mai 1998 (1998-05-28)	
A ✓	WO 95 28946 A (SCRIPPS RESEARCH INST) 2 novembre 1995 (1995-11-02)	
<input type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
° Catégories spéciales de documents cités:		
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
19 octobre 2000		26/10/2000
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale		Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Cervigni, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/01857

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9822503 A	28-05-1998	NL 1004539 C	20-05-1998
		AU 4970797 A	10-06-1998
		BR 9712955 A	07-12-1999
		EP 0941244 A	15-09-1999
WO 9528946 A	02-11-1995	US 5599790 A	04-02-1997
		AU 2366295 A	16-11-1995
		US 5919754 A	06-07-1999

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/01857

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K14/75 A61K38/36 A61P19/02 G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K A61K A61P G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, PAJ, EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98 22503 A (RAATS JOZEF MARIA HENDRIK ;SCHELLEKENS GERARDUS ANTONIUS (NL); HOE) 28 May 1998 (1998-05-28) ---	
A	WO 95 28946 A (SCRIPPS RESEARCH INST) 2 November 1995 (1995-11-02) -----	

☐

Further documents are listed in the continuation of box C.

☒

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 October 2000

Date of mailing of the international search report

26/10/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Cervigni, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/01857

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9822503 A	28-05-1998	NL 1004539 C AU 4970797 A BR 9712955 A EP 0941244 A	20-05-1998 10-06-1998 07-12-1999 15-09-1999
WO 9528946 A	02-11-1995	US 5599790 A AU 2366295 A US 5919754 A	04-02-1997 16-11-1995 06-07-1999

AIDE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 28 mars 2001 (28.03.01)	
Demande internationale no PCT/FR00/01857	Référence du dossier du déposant ou du mandataire MJPcb1249/2
Date du dépôt international (jour/mois/année) 30 juin 2000 (30.06.00)	Date de priorité (jour/mois/année) 01 juillet 1999 (01.07.99)
Déposant SERRE, Guy etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

☒ dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

19 janvier 2001 (19.01.01)

☐ dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite

☐ n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur: (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé Maria Kirchner no de téléphone: (41-22) 338.83.38
--	--

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

37

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

10/019439

Applicant's or agent's file reference MJPcb1249/2	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR00/01857	International filing date (day/month/year) 30 June 2000 (30.06.00)	Priority date (day/month/year) 01 July 1999 (01.07.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K 14/75		
Applicant UNIVERSITE PAUL SABATIER - TOULOUSE III		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>8</u> sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>

Date of submission of the demand 19 January 2001 (19.01.01)	Date of completion of this report 27 July 2001 (27.07.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/01857

I. Basis of the report**1. With regard to the elements of the international application:***

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
pages 1-19, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
pages 1-10, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the drawings:
pages 1/3-3/3, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-10	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-10	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-10	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Reference is made to the following documents:

D1: WO 98 22503 A (RAATS JOZEF MARIA HENDRIK; SCHELLEKENS GERARDUS ANTONIUS (NL); HOE) 28 May 1998 (1998-05-28)

D2: WO 95 28946 A (SCRIPPS RESEARCH INST) 2 November 1995 (1995-11-02)

D3: MASSON-BESSIERE ET AL.: 'The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the alpha and beta chains of fibrin', THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, , -2000, vol. 166, no. , pages 4177-4184.

1. Novelty

Document D1 describes **citrullinated derivatives of filaggrin molecules**. It is suggested that said derivatives are antigens involved in rheumatoid arthritis-related auto-immune response.

Document D2 describes therapeutical compositions consisting of fibrinogen-homologous molecules capable of binding to endothelial cells.

The present application describes **citrullinated derivatives of the alpha and beta chain of fibrin molecules.**

It follows that the subject matter of claims 1-10 is considered to be novel (PCT Article 33(2)).

2. Inventive step

Document D1 is considered to be the closest prior art (cf. point 1 above).

The subject matter of the claim differs by virtue of the nature of the antigen involved in the rheumatoid arthritis-related auto-immune response, i.e. the isolated citrullinated derivatives.

The problem that the present invention is intended to solve is that of isolating the antigen involved in the rheumatoid arthritis-related auto-immune response. Indeed, document D3, which was published later, shows that the antigens isolated in the prior art are the result of a cross reaction.

The solution disclosed in claims 1-3 involves isolating the citrullinated derivatives of the alpha and beta chain of fibrin molecules.

The prior art describes epitopes recognised by antifilaggrin autoantibodies. The epitopes are supported on the filaggrin molecule and have been shown to be citrullinated. The prior art includes no indications of the existence of other antigens recognised by antifilaggrin autoantibodies. Indeed, the fact that the antigens isolated in the prior art

are the result of an antigen/antibody cross reaction was not published until a later date (document D3). Therefore, it unlikely that a person skilled in the art would have attempted to isolate other antigens forming an antigen/antibody complex with the antifilaggrin autoantibody.

It follows that claims 1-10 are considered to involve an inventive step (PCT Article 33(3)).

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

Claims 1-3

Claims 1-3 disclose "a citrullinated polypeptide derived from all or part of the alpha and beta chain sequence of fibrin molecules...".

The "part(s)" of the alpha and beta chain of fibrin molecules cannot be accepted in claims 1-3 unless it/they are associated with the function thereof. Indeed, it is unlikely that **any** citrullinated **part** of the alpha and beta chain of fibrin molecules would have an antigenic function with respect to the antifilaggrin autoantibody.



REC'D 31 JUL 2001

WIPO

PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire MJPCb1249/2	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR00/01857	Date du dépôt international (jour/mois/année) 30/06/2000	Date de priorité (jour/mois/année) 01/07/1999
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C07K14/75		
Déposant UNIVERSITE PAUL SABATIER-TOULOUSE III		
<p>1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.</p> <p>2. Ce RAPPORT comprend 5 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).</p> <p>Ces annexes comprennent 8 feuilles.</p>		
<p>3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:</p> <ul style="list-style-type: none">I <input checked="" type="checkbox"/> Base du rapportII <input type="checkbox"/> PrioritéIII <input type="checkbox"/> Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielleIV <input type="checkbox"/> Absence d'unité de l'inventionV <input checked="" type="checkbox"/> Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclarationVI <input type="checkbox"/> Certains documents citésVII <input type="checkbox"/> Irrégularités dans la demande internationaleVIII <input checked="" type="checkbox"/> Observations relatives à la demande internationale		
Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 19/01/2001	Date d'achèvement du présent rapport 27.07.2001	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Hoff, C N° de téléphone +49 89 2399 7895 	

RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR00/01857

I. Bas du rapport

1. En ce qui concerne les **éléments** de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)*):

Description, pages:

1-19 version initiale

Revendications, N°:

1-10 version initiale

Dessins, feuilles:

1/3-3/3 version initiale

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/01857

- ☐ de la description, pages :
☐ des revendications, n°s :
☐ des dessins, feuilles :

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1-10 Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications 1-10 Non : Revendications
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-10 Non : Revendications

- 2. Citations et explications
voir feuille séparée**

VIII. Observations relatives à la demande internationale

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :
voir feuille séparée

Il est fait référence aux documents suivant:

D1: WO 98 22503 A (RAATS JOZEF MARIA HENDRIK ;SCHELLEKENS GERARDUS ANTONIUS (NL); HOE) 28 mai 1998 (1998-05-28)

D2 :WO 95 28946 A (SCRIPPS RESEARCH INST) 2 novembre 1995 (1995-11-02)

D3: MASSON-BESSIERE ET AL.: "The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the alpha and beta chains of fibrin", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, , -2000, Vol. 166, no. , pages 4177 à 4184

V.1 Nouveauté

Le document D1 décrit des **dérivés citrullinés des molécules de filaggrine**. Ces dérivés étaient suggérés comme étant les antigènes impliqués dans la réponse auto-immune associée à la polyarthrite rhumatoïde.

Le document D2 décrit des compositions thérapeutiques composées de molécules homologues du fibrinogène capables de se lier aux cellules endothéliales.

La présente application décrit des **dérivés citrullinés de la chaîne alpha et beta des molécules de fibrine**.

Par conséquent l'objet des revendications 1-10 est considéré comme étant nouveau (Article 33(2) PCT).

V.2 Activité inventive

Le document D1 est considéré comme étant l'état de la technique le plus proche (cf paragraphe V.1).

L'objet de la revendication diffère par la nature de l'antigène impliqué dans la réponse auto-immune associée à la polyarthrite rhumatoïde c'est à dire des dérivés citrullinés isolés.

Le problème que se pose à résoudre la présente application consiste à isoler

l'antigène impliqué dans la réponse auto-immune associée à la polyarthrite rhumatoïde. En effet le document D3, publié ultérieurement montre que les antigènes isolés dans l'art antérieur sont dus à une réaction croisée.

La solution, comme divulguée dans les revendications 1-3, consiste à isoler les dérivés citrullinés de la chaîne alpha et beta des molécules de fibrine.

L'art antérieur décrit des épitopes reconnus par les auto-anticorps anti-filaggrine. Ces épitopes sont portés par la molécule de filaggrine et se sont avérés citrullinés.

Il n'y a pas d'indications dans l'art intérieur quant à l'existence d'autres antigènes reconnus par les auto-anticorps anti-filaggrines. En effet le fait que les antigènes isolés dans l'art antérieur sont issus d'une réaction croisée antigène/anticorps n'a été publié qu'ultérieurement (document D3). Il est donc peu probable que l'homme du métier aurait tenté d'isoler d'autres antigènes formant un complexe antigène/anticorps avec l'auto-anticorps anti-filaggrine.

Par conséquent les revendications 1-10 sont considérées comme impliquant une activité inventive selon l'Article 33(3) PCT.

VIII Revendications 1-3

Les revendications 1-3 divulgue "un polypeptide citrulliné dérivé de tout ou de parti de la séquence chaîne alpha et beta des molécules de fibrine...".

La/les "partie(s)" de chaîne alpha et beta des molécules de fibrine ne sont acceptées dans les revendications 1-3 que si elles **sont associées à leur fonction**. En effet, il est peu probable que **n'importe quelle partie** citrullinée de la chaîne alpha et beta des molécules de fibrine présente une fonction antigénique vis à vis de l' auto-anticorps anti-filaggrine.